

무당벌레(*Harmonia axyridis*)의 중장내 먹이 Acid Phosphatase(AP)의 활성변화

Persistence of the Enzymatic Activity of Dietary Acid
Phosphatases from the Lumen of the Midgut of
the Lady Beetle, *Harmonia axyridis*

홍옥기¹ · 박해철² · 박규택¹ · 박용철¹

Oak Kee Hong¹, Hae Chul Park², Kyu Tek Park¹ and Yong Chul Park¹

ABSTRACT Acid phosphatase(AP) of the aphid, *Megoura crassicauda* and the major component of the lady beetle's artificial diet, fresh chicken liver, was adapted as a model protein to study the digestion of diet proteins in the midgut of *Harmonia axyridis*. The lady beetle did not secrete its own AP into the lumen of the midgut. The aphid and the live chicken liver had AP which was still alive in enzymatic activity from the extract of the lumen of the midgut of the lady beetle. The digestive ability of the lady beetle on proteins turned out to be different depending on food sources. In the lumen of the midgut of the lady beetle, though most of AP of live chicken liver lost its activity within 12 hours, that of *M. crassicauda* kept strong enzymatic activity up to 24 hours.

KEY WORDS *Harmonia axyridis*, midgut, protein digestion, dietary acid phosphatase

초 록 무당벌레(*Harmonia axyridis*)의 중장 내에서 먹이 단백질이 소화되는 과정을 연구하기 위하여 진딧물과 생간의 AP를 모델 단백질로 이용하였다. 천연 먹이인 긴꼬리볼록진딧물(*Megoura crassicauda*)과 인공 먹이인 닭의 생간은 각각 고유의 acid phosphatase(AP)를 가지고 있으며, 무당벌레의 중장 내부로 들어온 후에도 활성을 나타내었다. 무당벌레의 장에서 자체적으로 생성하여 중장 내부로 분비하는 AP는 관찰되지 않았다. 무당벌레의 단백질 소화력은 먹이의 종류에 따라 차이를 나타내는 경향을 보였다. 생간의 AP는 무당벌레 중장내에서 12시간이 지나면 거의 활성을 잃어 버리나 긴꼬리볼록진딧물의 AP는 24시간이 경과하여도 강한 활성을 나타내었다.

검색어 무당벌레, 중장, 단백질소화, 먹이 acid phosphatase

곤충의 소화기관은 식성과 먹이의 양분조성에 따라 분비하는 효소의 종류와 양에 차이를 보인다(Applebaum 1985, Chapman 1985). 초식성 곤충의 경우는 탄수화물을 분해하는 효소가 더 많이 분비되고 잡식성 곤충의 경우는 단백질가수분해효소가 많이 분비된다(Cristopher & Mathavan 1984). 무당벌레류에서는 육식성 무당벌레가 초식성 무당벌레에 비하여 훨씬 더 높은 protease, lipase와 trehalase의 활성을 보인다(Sakurai 1968).

포식성인 무당벌레(*Harmonia axyridis*)의 성장과 생식활동은 먹이의 영양성분, 특히 단백질의 종류와

조성에 따라 심한 차이를 보인다(Okada & Matsuka 1973, Hukusima & Takeda 1975, Matsuka & Okada 1975). 먹이 단백질은 일차적으로 무당벌레의 소화계에 영향을 줄 것으로 생각되나 이에 대한 연구가 아직 미흡한 실정이다. 무당벌레의 단백질소화에 관한 연구를 체계적으로 수행하기 위해서는 무당벌레의 장 내부에서 먹이 단백질이 겪게되는 일련의 변화 과정을 보여줄 수 있는 모델 단백질이 필요하다. 본 연구는 무당벌레의 천연 또는 인공 먹이에 존재하는 acid phosphatase(AP)를 모델 단백질로 하여 무당벌레의 단백질 소화에 관한 기초적인

¹강원대학교 농과대학 농생물학과

²산림청 임업연구원 산림생태과 생물다양성실

조사를 한 것이다.

재료 및 방법

실험곤충

본 실험에 사용한 무당벌레는 6월부터 8월까지 춘천 근교 야외에서 유충과 성충을 채집하여 항온기 (25°C, 16L:8D)에서 사육하였다. 채집한 개체에는 먹이로 갈퀴나물(*Vicia amonea*)에서 채집한 긴꼬리 불룩진딧물(*Megoura crassicauda*), 인공 먹이로서는 닭의 생간, 삶은 간, 삶은 계란 및 화분을 사용하였다. 20마리씩 직경 10 cm, 높이 2 cm의 샐아레에 담아 먹이를 공급하였고, 인공 먹이의 경우엔 따로 물 적신 솜을 넣어 수분을 공급하였다.

장내용물 채취 및 AP 활성 측정

무당벌레를 48시간 굶긴 후 6시간 동안 먹이를 섭식시키고 다시 절식시키면서 0, 6, 12, 24시간 간격으로 중장을 꺼내어 0.15% NaCl용액에서 3회 세척하였다. 중장내용물은 25mM Tris-HCl buffer pH 6.8로 희석하였고, 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 지질층을 제거한 상층액만을 모아 -20°C에서 보관하였다.

Native PAGE는 Laemmli(1970)법으로 9% 아크릴 아마이드 농도에서 100V, 4°C에서 3시간 동안 실시하였다. 10 mM α -naphthyl phosphate를 기질로 하여 33 mM Tris-HCl buffer pH 5.0에서 10 mM Fast blue TR로 염색하여 밴드확인을 통하여 AP 활성을 측정하였다(Rao et al. 1981).

결 과

무당벌레(*Harmonia axyridis*)의 먹이에 흔히 존재하는 acid phosphatase(AP)를 모델로 하여 무당벌레의 중장 내부에서 먹이의 단백질이 변성 또는 분해되지 않고 잔존하는 시간 즉, 먹이로부터 온 효소의 활성이 지속되는 시간을 비교, 연구하였다. 실험에 적합한 AP를 갖고 있는 진딧물을 선별하기 위하여 긴꼬리불룩진딧물(*Megoura crassicauda*), 콩진딧물(*Aphis glycines*), 옥수수테두리진딧물(*Rhopalosiphum maidis*), 복숭아가루진딧물(*Hyalopterus pruni*),

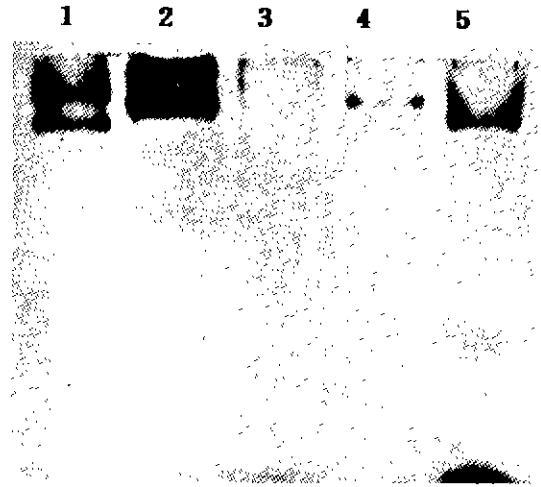


Fig. 1. Electrophoretic pattern on acid phosphatases of aphids. Aphids were homogenized in 0.025 M Tris-HCl pH 6.8 buffer and the homogenates was centrifuged at 13,000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was separated under 9% native PAGE at 100 volts for 3 hours. The gel was stained for acid phosphatase with α -naphthyl phosphate as substrate and Fast blue TR. 1: *Megoura crassicauda*; 2: *Aphis glycines*; 3: *Rhopalosiphum maidis*; 4: *Hyalopterus pruni*; 5: *Macrosiphoniella yomogifoliae*.

쭉잎꼬마수염진딧물(*Macrosiphoniella yomogifoliae*) 5종을 채집하여 전기영동을 한 후 AP 활성을 측정하였다. 5종의 진딧물은 모두 음극쪽에 AP를 갖는 공통점이 있었으며 이 중에 긴꼬리불룩진딧물이 뚜렷한 AP의 활성을 가질 뿐만 아니라(Fig. 1) 지속적으로 대량 채집이 가능하여 실험용으로 선별하였다. 인공 먹이의 주요 성분인 닭의 생간도 음극쪽에서 AP가 활성을 나타내었다(Fig. 2).

긴꼬리불룩진딧물과 닭의 생간에 존재하는 AP는 일단 무당벌레의 중장 내부로 들어가면 곧바로(최대 6시간 이내) 구조적인 변화가 일어난다는 것을 알 수 있었다. 긴꼬리불룩진딧물에 존재하는 2개의 AP 밴드는 무당벌레의 유충이나 성충의 중장 내부로 들어가면 분리되지 않고 resolving gel 위에 남아있는 것과 명확히 분리되는 1개의 밴드로 나타난다(Fig. 2). 생간의 AP는 음극쪽에 경계가 불명확한 여러개의 밴드로 존재하지만 무당벌레의 장내에서는 하나의 짙은 밴드로 변하게 된다(Fig. 2).

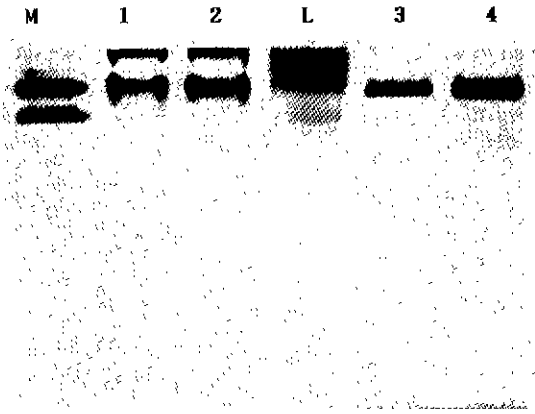


Fig. 2. Electrophoretic pattern on acid phosphatases of *Megoura crassicauda*, live chicken liver, and midgut contents of *Harmonia axyridis* fed on *M. crassicauda* or live chicken liver. Samples were separated under 9% native PAGE at 100 volts for 3 hours. The gel was stained for acid phosphatase with α -naphthyl phosphate as substrate and Fast blue TR. M: *M. crassicauda*; 1: midgut contents of *H. axyridis* larvae fed *M. crassicauda*; 2: midgut contents of *H. axyridis* adults fed *M. crassicauda*; L: live chicken liver; 3: midgut contents *H. axyridis* larvae fed live chicken liver, 4: midgut contents *H. axyridis* adults fed live chicken liver.

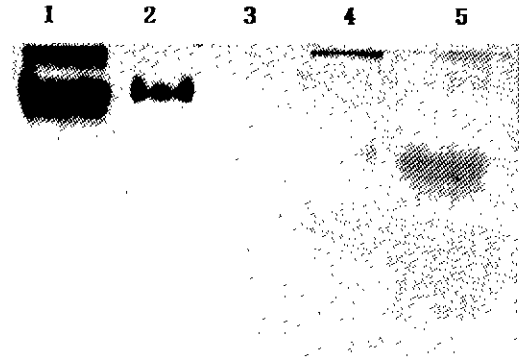


Fig. 3. Electrophoretic pattern on acid phosphatases of midgut contents of *Harmonia axyridis* adults fed on *Megoura crassicauda* and artificial foods. Samples were separated under 9% native PAGE at 100 volts for 3 hours. The gel was stained for acid phosphatase with α -naphthyl phosphate as substrate and Fast blue TR. The bands in lanes 3, 4 and 5 were not acid phosphatases since they were visible even before the staining. 1: *M. crassicauda*; 2: live chicken liver; 3: boiled chicken liver; 4: boiled egg; 5: pollen.

무당벌레의 중장 내부에서 발견되는 AP는 무당벌레가 자체적으로 이를 합성하여 장 내부로 분비시켰을 가능성도 있으므로 이를 규명하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다. 무당벌레에게 AP 활성을 갖고 있는 먹이로서 긴꼬리볼록진딧물과 닭의 생간, AP 활성을 없애기 위해 열처리한 먹이로서 닭의 삶은 간과 삶은 계란 그리고 AP 활성이 전혀 없는 화분을 각각 사용하였다. 그 결과 AP 활성이 있는 먹이를 섭취한 무당벌레의 중장내용물은 AP 활성을 보이나, AP 활성을 제거한 먹이를 섭취하였을 때는 AP 활성을 가지는 밴드가 나타나지 않았다(Fig. 3). 삶은 간, 삶은 계란, 화분의 희미한 밴드와 삶은 달걀에서 음극쪽에 나타나는 뚜렷한 밴드는 AP 염색을 하기 전부터 나타나는 것으로 먹이가 가지고 있는 색소에 의하여 만들어진 것이다(Fig. 3).

무당벌레 성충의 중장 내부에서 생간과 진딧물의 AP는 활성의 지속기간에 커다란 차이를 보였다. 생간의 AP의 활성은 12시간이 지나면 급격히 떨어지고, 24시간이 되면 거의 찾아볼 수 없다. 긴꼬리볼

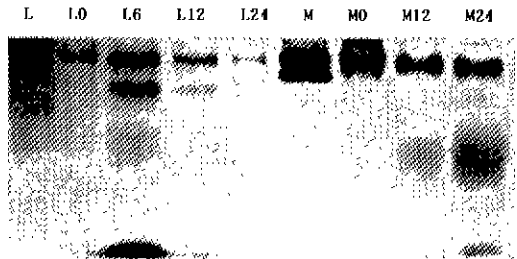


Fig. 4. Electrophoretic pattern on the diet acid phosphatases extracted from the lumen of the midgut of *Harmonia axyridis* adults. The lady beetle was starved for 48 h and fed on *Megoura crassicauda* or live chicken liver for 6 h. Gut contents were collected from the lumen of the midgut of *H. axyridis* with an interval of 0, 6, 12, 24 hours after feeding. Samples were separated under 9% native PAGE at 100 volts for 3 hours. The gel was stained for acid phosphatase with α -naphthyl phosphate as substrate and Fast blue TR. The broad weak bands in the middle of the panel was not acid phosphatases since they were visible before the staining. L: live chicken liver; L0, L6, L12, L24: midgut contents of *H. axyridis* fed on live chicken liver with a sampling time interval of 0, 6, 12 and 24 hr after feeding; M, *M. crassicauda*; M0, M12, M24: midgut contents of *H. axyridis* fed on *M. crassicauda* with a sampling time interval of 0, 6, 12 and 24 hr after starvation.

록진딧물의 경우에는 resolving gel 위에 잔존하던 AP는 12시간이 지나면 사라지나 겔 내에서 1개의 밴드로 존재하던 AP는 24시간이 되어도 강한 활성을 유지한다(Fig. 4). Fig. 4에서 겔의 중간부위에서 희미하게 나타나는 부정형의 밴드는 진딧물과 생간이 가지고 있는 색소에 의한 것이다.

고 찰

무당벌레의 단백질에 대한 소화기작을 연구하는데 알맞은 모델 단백질로 무당벌레의 먹이인 진딧물과 생간의 AP가 적합한 것으로 나타났다. 먹이의 AP는 무당벌레의 중장 내로 들어온 후에 최소 24시간 활성을 유지하며 전기영동 후 직접 발색반응으로 밴드가 확인될 수 있는 장점이 있다. 또한 무당벌레의 중장이 자체적으로 합성하여 분비시키는 AP가 존재하지 않기 때문에(Fig. 3) 먹이로부터 온 단백질인 AP의 변성과 분해되는 과정을 이해하는데 결정적인 도움이 된다.

무당벌레의 천연 먹이인 5종의 진딧물을 전신마쇄하여 전기영동하여 본 결과, 긴꼬리볼록진딧물이 AP 활성이 뚜렷하고(Fig. 1) 채집이 용이하며 봄부터 늦가을까지 발견되는 장점이 있었다. 먹이의 차이에 따른 무당벌레의 단백질 소화력을 비교하기 위하여 인공 먹이의 주성분인 닭의 생간을 전기영동하여 본 결과, 상당량의 AP가 존재하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 무당벌레가 AP의 활성을 제거시킨 닭의 삶은 간이나 계란의 노른자 또는 AP가 존재하지 않는 화분을 섭식하였을때는 무당벌레의 중장 내부에서는 AP 활성이 나타나지 않는다(Fig. 3). 일반적으로 AP는 조직이나 세포의 막이나 소기관 내에 존재하는 까닭에(Nath & Butler 1971, Narise 1984) AP가 무당벌레의 중장에서 자체적으로 생성되어 장 내부로 분비되었을 가능성이 희박하다. 한편 무당벌레의 중장 내부의 pH는 5.2~5.8로 알려지고 있어(Sakurai 1968) 만약 무당벌레가 고유의 AP를 중장 내부로 분비하였다면 본 실험, 즉 약산성(pH 5.0)의 조건에서 활성을 나타냈어야 하며 존재한다고 할지라도 소량일 가능성이 높다.

먹이의 차이에 따라 AP의 변성 또는 분해되는 시간에 상당한 차이를 보이고 있다. 생간의 AP는 무당벌레의 중장 내부에서 12시간이 되면 거의 활

성을 잃어 버리나 긴꼬리볼록진딧물의 AP는 24시간이 지나도 강한 활성을 유지한다. 먹이의 AP는 무당벌레의 중장 내부로 들어가면 전기적 이동도가 변하게 된다. 무당벌레의 중장 내부에서 긴꼬리볼록진딧물에 존재하던 2개의 AP는 시간이 지나면서 1개의 밴드만이 나타나고 생간의 AP는 음극쪽에 경계가 불명확한 여러개의 밴드로 존재하나 하나의 짙은 밴드로 변하게 된다(Fig. 2). 먹이에 존재하는 불분명한 여러개의 AP 밴드가 무당벌레의 중장 내부로 들어가면 전기적 이동도에 있어서 차이를 보이면서 밴드가 분명하게 나타나는 이유는 AP가 수용성으로 독립적으로 존재하기 보다는 여러가지 세포 성분, 특히 지용성 물질과 결합하고 있을 가능성이 있다는 것을 암시한다. 여러 곤충에서도 phosphatase는 세포 또는 소기관의 막과 결합하고 있는 상태이다(Houks 1984, Nanse 1984, Houk & Hardy 1987, Psarianos *et al.* 1987, Bang & Yoe 1990, Yamamoto *et al.* 1991). 또한 진딧물과 생간은 전기영동을 방해하는 물질이 많아 AP의 분리가 어렵다. 그러나 이러한 현상은 무당벌레 중장내로 들어가서는 방해물질이 제거되거나 본래 세포막 성분과 결합하고 있던 먹이의 AP가 분리되어 약간의 구조적 변형이 일어나 명확한 밴드로 나타나는 것으로 생각된다.

인 용 문 헌

- Applebaum, S.W. 1985. Biochemistry of digestion. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut G.A. and Gilbert L.I.), 4: 279-311. Pergamon Press, New York
- Bang, I.S. & S.M. Yoe. 1990. The activity and purification of acid phosphatase of *Pieris rapae* L. *Korean J. Entomol.* 20(4): 231-237.
- Chapman, C.F. 1985. Coordination of digestion. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut G.A. and Gilbert L.I.), 4: 213-240. Pergamon Press, New York.
- Choi, S.Y. 1984. Preliminary studies on the aphidivorous activity of coccinellid beetles (*Harmonia axyridis* PALLAS) and their artificial rearing. *Seoul Nat'l Univ., Coll. of Agric. Bull.* 8(1): 55-64.
- Christopher, M.S.M. & S. Mathavan. 1985. Regulation of digestive enzyme activity in the larvae of *Catopsilia crocale* (Lepidoptera). *J. Insect Physiol.* 31(3): 217-

221.

- Houk, E.J. & J.L. Hardy. 1984. Alkaline phosphatases of the mosquito *Culex tarsalis coquillett*. *Comp. Biochem. Physiol.* **78B**(2): 303-310.
- Houk, E.J. & J.L. Hardy. 1987. Acid phosphatases of the mosquito *Culex tarsalis coquillett*. *Comp. Biochem. Physiol.* **87B**(4): 773-782.
- Hokusima, S. & S. Takeda. 1975. Artificial diets for larvae of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), an insect predator of aphids and scale insects. *Res. Bull. Agr. Gifu Univ.* **38**: 49-53.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **22**: 680-685.
- Matsuka, M. & I. Okada. 1975. Nutritional studies of an aphidophagous coccinellid, *Harmonia axyridis* (I) Examination of artificial diets for the larval growth with special reference to drone honeybee powder. *Bull. Fac. Agr. Tamagawa Univ.* **15**: 1-9.
- Narise, S. 1984. Purification and properties of acid phosphatase from *Drosophila virilis*. *Insect Biochem.* **14**(4): 473-480.
- Nath, J. & L. Butler. 1971. Acid phosphatase during development of the black carpet beetle *Attagenus megatoma* (Feb.). *Can. J. Biochem.* **49**: 311-315.
- Okada, I. & M. Matsuka. 1973. Artificial rearing of *Harmonia axyridis* on pulverized drone honey bee brood. *Environ. Ent.* **2**(2): 301-302.
- Psarianos, C.G., M. Lampropoulou & V.J. Marmaras. 1987. Alkaline phosphatase in the integument of *Ceratitis capitata*. Developmental profile and functional properties. *Insect Biochem.* **17**(4): 619-624.
- Rao, G.R., H.N. Aithal, F.G. Toback, & G.S. Getz. 1981. New form of acid phosphatase during lysosome biogenesis. *Biochem. J.* **198**: 9-15.
- Sakurai, H. 1968. Physiological studies on the digestion of coccinellid beetles (Coleoptera: Coccinellidae), with special reference to their food habits. *Appl. Ent. Zool.* **3**(3): 130-138.
- Yamamoto, H., M. Azuma & M. Eguchi. 1991. Further characterization of alkaline phosphatase isozymes in the silkworm midgut: Effects of amino acids and metal ions and comparison of sugar chains. *Comp. Biochem. Physiol.* **99B**(2): 437-443.

(1994년 12월 19일 접수)